



AValiação DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO ARTEPELIN C NO TESTE DE MICRONÚCLEOS IN VITRO

Jordana Ariane Nunes da Rosa¹
Francisco Adalberto do Nascimento Paz²
Ana Paula de Souza³
Mauricio Lehmann⁴
Rafael Rodrigues Dihl⁵

Resumo

Estudos fitoquímicos identificaram o composto polifenólico Artepelin C (Art C - ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) como principal componente bioativo da própolis brasileira. O Art C vem sendo estudado por ter atividade antioxidante, indutor de apoptose e imunomodulatório. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação mutagênica do Artepelin C em uma linhagem celular humana metabolicamente competente (HepG2). Para tanto, foi utilizado o teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN). Para o teste, as células foram semeadas em placas de 24 poços e cultivadas por 24 h. Após este período, as células foram submetidas a diferentes concentrações do Art. C (3,75 – 2000 µM). Transcorridas 44h do início do experimento, adicionou-se a citocalasina - B, por mais 28 h. As células foram tripsinizadas e coletadas em citocentrífuga, fixadas em lâminas de vidro e coradas para a realização das análises em microscópio óptico. Os resultados demonstraram que em relação ao índice de divisão nuclear (IDN), o Art C causou inibição da proliferação celular quando comparado ao controle negativo. Com base nos resultados observados para o IDN, concentrações não citotóxicas do Art C foram utilizadas para a avaliação da indução de micronúcleos em células HepG2. Desta forma, a ausência de mutagenicidade observada neste estudo pode estar associada ao processo de biotransformação nas células HepG2. Considerando que esta linhagem celular possui altos níveis de enzimas do citocromo P450, é possível que o Artepelin C seja encaminhado para uma via de detoxificação, não sendo capaz de induzir danos no DNA.

Palavras-chave: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico; CBMN; HepG2; IDN; Micronúcleos

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são de grande importância para a população, pois são usadas constantemente no tratamento de inúmeras doenças. Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos receitados mundialmente são provenientes de recursos naturais, o que levanta a

1 Aluna do curso de Biologia ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS - jordana.nunes01@gmail.com

2 Doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

3 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

4 Professor do curso de Engenharia Ambiental/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

5 Professor dos cursos de graduação em Ciências Biológicas e Biomedicina e do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – rafael.rodriques@ulbra.br

necessidade de avaliar os benefícios terapêuticos e os riscos associado ao uso destas plantas para a saúde humana (CANTON e ONOFRE, 2010).

A família Asteraceae destaca-se na lista de uma variedade de plantas utilizadas como recurso medicinal, sendo a espécie *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim-de-vassoura; alecrim-do-campo; vassourinha, um dos principais membros desta família. É uma planta muito utilizada na medicina tradicional com a finalidade de combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris, entre outros sintomas (CANTON e ONOFRE, 2010). É a fonte botânica mais importante para a obtenção de uma própolis brasileira, chamada de própolis verde, devido a sua cor (CANTON e ONOFRE, 2010; RODRIGUES et al., 2009, CAMPOS, 2016).

A própolis é uma substância com características de resina, de aroma característico, cuja cor varia em decorrência a sua origem botânica e idade. É coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, em diferentes partes das plantas. Desde a antiguidade, a própolis já era utilizada como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções, pois, possui diversas propriedades terapêuticas e biológicas. Na própolis verde já foram identificados mais de 200 compostos químicos e apesar de existir uma variação química na constituição dos mais diversos tipos de própolis encontradas nas regiões sudeste e sul do Brasil, todos apresentam em sua composição o composto polifenólico Artepelin C (ArtC) como principal composto bioativo (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (RESENDE et al., 2007; MATSUDA E ALMEIDA-MURADIAN,2008).

O Artepelin C vem sendo alvo de estudos em relação às suas atividades biológicas. Estudo recente, sugere que o Artepelin C promove a diferenciação de adipócitos e a entrada de glicose nestas células, em parte através da ligação direta ao receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPAR γ) e, desta forma, o consumo desta substância poderia reduzir o risco de diabetes tipo 2 (CHOI et al., 2011). A ação genotóxica e antigenotóxica do ArtC foi recentemente investigada nos testes cometa e micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) em células V79 de hâmsster chinês. Os resultados apresentaram que o composto demonstrou atividade genotóxica na concentração mais alta, e efeito antigenotóxico nas concentrações mais baixas, em relação as lesões induzidas por metil-metano-sulfonato (MMS), nos dois testes que foram realizados. Os autores associaram este efeito protetor ao ArtC, provavelmente por sua capacidade antioxidante (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade mutagênica do Artepelin C em células de hepatoma humano (HepG2) no teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN).

METODOLOGIA

Agentes químicos

O Artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), CAS no. 72944-19-5, foi adquirido da Wako Chemicals USA, Inc. através do Grupo Demorellis/DMSscientific, São Paulo-SP.

Cultivo celular

As células HepG2 foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, número de catálogo 0103). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (TPP), contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (combinado de estreptomomicina e penicilina a 1% e gentamicina a 0,1%, ambos obtidos da Gibco) a 37°C em uma incubadora (Thermo Scientific) com 5% de CO₂.

Teste de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese – CBMN

Para a realização dos experimentos, as células foram semeadas em placas de cultivo celular com 24 poços (TPP), sendo adicionadas em cada poço aproximadamente 100.000 células. Os testes foram realizados em duplicata e em paralelo. Após 24 h de cultivo, as células foram submetidas a diferentes concentrações do Artepelin C por um período de 4 h. O fim dos tratamentos ocorreu após 44 h do início da cultura, através da lavagem das células com solução salina-fosfato (PBS). Em seguida foi adicionado novo meio de cultura contendo CIT-B, por mais 28 h. O tempo total de incubação das células foi de 72h a 37°C. Após este período, as células foram tripsinizadas e coletadas em citocentrífuga (Presvac) (5min a 700 rpm), para serem fixadas em lâminas de vidro, coradas (Instant-Prov/ Newprov®) e desta forma prontas para a realização das análises em microscópio óptico com um aumento de 1000x. A comparação estatística foi realizada por meio da análise da variância (one-way ANOVA) com teste post hoc de Dunnett para uma significância estatística $\alpha=0,05$.

Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata, sendo analisadas 1000 células por tratamento. O critério de seleção, assim como o de contagem de células binucleadas com micronúcleos foi definido de acordo com FENECH (2007). O parâmetro utilizado para a avaliação da cinética celular foi o Índice de Divisão Nuclear. Nesse sentido, 500 células foram analisadas por cultura e verificadas quanto à frequência de células mono, bi, tri e tetranucleadas. A partir destes dados o IDN foi calculado de acordo com a fórmula:

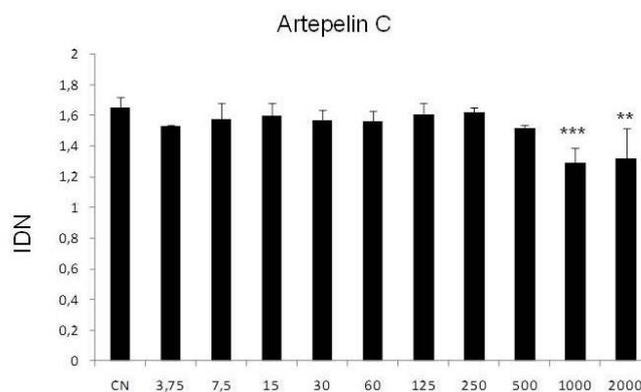
$$\text{IDN} = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / \text{NT}$$

M1-M4 representam o número de células com 1-4 núcleos e NT corresponde ao número total de células analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos referentes ao IDN estão apresentados na Figura 1. Das concentrações que foram testadas com Art C (3,75 – 2000 μM), o composto demonstrou possuir efeito citotóxico nas concentrações de 1000 e 2000 μM , quando comparados ao controle negativo. Esta redução no IDN observada foi, de fato, significativa entre as concentrações mais altas do Artepelin C e o controle negativo, indicando a ação deste composto sobre a proliferação celular.

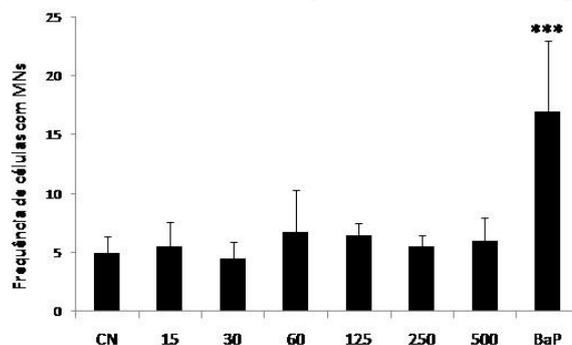
Figura 1- Efeitos da exposição das células HepG2 ao Art C (3,75 – 2000 μM) sobre o Índice de Divisão Nuclear (IDN).



One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Para a avaliação da mutagenicidade associada ao Art. C, foram utilizadas as concentrações não citotóxicas, determinadas através dos resultados do IDN. Desta forma, não foram observados aumentos significativos nas frequências de micronúcleos das células expostas ao Artepelin C em comparação às células do controle negativo (Figura 2).

Figura 2- Frequência de MNs após exposição das células HepG2 ao Art C (3,75 – 500 μ M). CN= Controle Negativo. BaP= Benzopireno.



One-way ANOVA e teste post-hoc de Dunnett. *** $p < 0,001$

Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos. Quando avaliado *in vivo* através dos testes de micronúcleos em células do sangue periférico e teste cometa em células do fígado de camundongos machos Swiss, o Art C não induziu lesões no DNA (MONTEIRO NETO et al., 2011). Neste estudo foram utilizadas três concentrações de Art C: 0,4; 0,8 e 1,6 $\text{mg.kg}^{-1}\text{p.c.}$ Adicionalmente, o Art C não exerceu atividade mutagênica quando avaliado no teste de Ames em *Salmonella thyphimurium* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, na presença e ausência de metabolização exógena (S9), em concentrações que variaram de 0,69 a 10,99 $\mu\text{g/placa}$ (RESENDE et al., 2012). O Art C não exerceu atividade mutagênica quando avaliado no teste de Ames em *Salmonella thyphimurium* nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, na presença e ausência de metabolização exógena (S9), em concentrações que variaram de 0,69 a 10,99 $\mu\text{g/placa}$ (RESENDE et al., 2012). A ausência de mutagenicidade observada neste estudo pode estar associada ao processo de biotransformação nas células HepG2. Considerando que essa linhagem celular possui altos níveis de enzimas do citocromo P450 é possível que o Art C seja encaminhado para uma via de detoxificação, não sendo capaz de induzir danos no DNA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que as diferentes concentrações de Art C não foram mutagênicas às células HepG2, no ensaio CBMN, no tratamento de 24 h. Entretanto, um número maior de experimentos, ampliando o tempo de exposição das células ao Art C, deve ser realizado, para confirmar os resultados obtidos até o momento.

AGRADECIMENTOS

Para a FAPERGS pelo auxílio financeiro por meio do edital PqG 2014 e pela concessão da bolsa PROBITI.

REFERÊNCIAS

CAMPOS, Francinete R.; BRESSAN, Jaqueline; CERQUEIRA, Leticia Bonancio; JASINSKI, Vanessa Cristina Godoy. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemical Biodiversity**. 2016; 13: 1-17.

CANTON, Marilde; ONOFRE, Sideney Becker. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2010; 20(3): 348-354.

CHOI, Sun-Sil; CHA, Byung-Yoon; LIDA, Kagami; LEE, Young-Sil; YONEZAWA, Takayuki; TERUYA, Toshiaki; NAGAI, Kazuo; WOO, Je-Tae. Artepillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 925-933, apr. 2011.

DE OLIVEIRA, Pollyanna Francielli; LIMA, Ildercilio Mota De Souza; MONTEIRO NETO, Moacir de Azevedo Bentes; BASTOS, Jairo Kenupp; DA SILVA FILHO, Ademar Alves; TAVARES, Denise Crispim. Evaluation of Genotoxicity and Antigenotoxicity of Artepillin C in V79 Cells by the Comet and Micronucleus Assays. **Nutrition and Cancer**. dx.doi.org/10.1080/01635581.2013.815233, 2013.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**. v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

MATSUDA, Adriana Hitomi, DE ALMEIDA-MURADIAN, Ligia Bicudo. Validated method for the quantification of artepillin-C in brazilian propolis. **Phytochemical Analysis**. v. 19, p. 179-183, 2008.

MONTEIRO NETO MAB, LIMA IMS, FURTADO RA, BASTOS JK, DA SILVA FILHO, AA., TAVARES, D.C. In vivo assessment of genotoxic and antigenotoxic effects of artepillin C using the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**. 2011; 31: 714–719.

RESENDE, Flávia Aparecida, ALVES, Jaqueline Morais, MUNARI, Carla Carolina, SENEDESE, Juliana Marques, SOUSA, João Paulo, BASTOS, Jairo Kenupp, TAVARES, Denise Crispim. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v. 634, p. 112-118, 2007.

RODRIGUES, Carmem. F; DIAS, Jacqueline H.; SEMEDO, Juliane G.; et al. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). **Journal of Ethnopharmacology**. 2009; 124: 321-324.